22 (19) 日本国特許庁 (JP)

퐾 4 盂 华

(11)特許番号 (B2) 第2649287号

(45)発行日 平成9年(1997)9月3日

(24)登録日 平成9年(1997)5月16日

48 2/00 A 0 1 H C 1 2 N 斤内盤阻毒导

5/10

C12N A 0 1 H (51) Inta.

\$

技術表示個所

ပ

謝泉項の数13(全 13 頁)

(21) 田田市中	存置平 6-503169	(73) 特許権者	66666666
			日本たばこ産業株式会社
(86) (22) (11 10 (B)	平成5年(1983)7月6日		東京都梯区虎ノ門2丁目2番1号
		(72) 発明者	备江井 拾弘
(86)国際出版条件	PCT/1P93/00926		静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たば
(87) 田原公園毎号	WO94/00977		こ産業株式会社遺伝育種研究所内
(87) 国際公開日	平成6年(1994)1月20日	(72) 発明者	小雅 数磁
(31) 優先權主張森母	各数 平4 -204464		静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たば
(32)優先日	平4 (1992) 7 月 7 日		に産業株式会社遺伝青穂研究所内
(33)優先檔主張爾	日本 (JP)	(74) feat	弁理士 谷川 英次郎
		都全官	11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11
			> 章 ジロ 神経

(54) 【発明の名称】 洋子棋植物の形質振復方法

37 【特許請求の範囲】

税分化した培養組織を形質転換することから成る単子薬 【結束項1】所盤の遺伝子を含有するアグロバクテリウ 4周相的で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は 直物の形質転換方法 【開求項2】 前記単子葉植物がイネ科植物である開求項 記載の方法。

(制永項3)前記単子葉植物がイネである請求項1記載

[翻來囚4] 前記の単子禁植物がトウモロコシである調 4項 1 記載の方法

음

【静水項5】前配アグロバクテリウム属細菌は、Tiまた Agrobacterum tumefacionsのTiブラスミドpTiBo542 #Riブラスミドを持つアグロバクテリウム属相笛であっ

のヴィルレンス観域由来のDNA断片を含むプラスミドを

導入したアグロパクテリウム関細菌である請求項1ない し4いずれか1項に記載の方法。

【請求項6】前記DNW断片を含むブラスミドはpTOK162又 cterium tumefacionsである翻求項!ないし8のいずれ 「請求項7】前記アグロバクテリウム隅細菌は、 はその誘導体である請求項5記載の方法。 か1項に記載の方法

【請求項8】形質転換操作に用いるアグロバクテリウム **阪細菌の菌混炭が1ぴ~1ぴ 1 細菌/mlである酵水項 1 ない** し7のいずれか1項に記載の方法。

の前処理を行わず形質転換に供する請求項」ないし8の 【耕水項9】 前記の培養組織を酵素処理や傷つけるなど いずれか1項に記載の方法

後、脱分化過程または脱分化状態で形質転換細胞または 【請求項10】前記の培養組織を形質転換に供試した

3

特許2848287

8質転換組織を適抜する請求項1ないし9のいずれか1

瓜に記載の方法。

【翻求項11】前記既分化過程にある培費組織は、外植 **片を航分化誘導倍地に置床後7日以上のカルス形成過程** にある培養組織である請求項1ないし9のいずれか1項 **に記載の方法** 【請求項12】前記培養組織が単子葉植物の体細胞由来 の培養組織である請求項1ないし11のいずれか1項に配 数の方法。

【静水項 | 3】培養組織が正常な個体を再生する能力を 付する組織である請求項1ないし22のいずれか1項に配

発明の詳細な説明

技術分野

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

クトロポレーション法、ポリエチレングリコール法(RE 単子薬植物の形質転換方法としては、従来より、エレ

エレクトロポレーション法は、プロトプラストと目的 のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることに G供)、バーティクルガン供その他が知られている。

yama K.et al., 1988; Bio/Technol.6:1072-1074, Shimam oto K.et al., 1989; Nature 338: 274 - 276, Rhodes C.A.et る。現在、最も再現性のある手法で、この方法で種々の 遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている(Tori ラストから個体再生までには数か月を要するので、形質 転換体を得るのに時間がかかる、3) 培穀期間が長期化 されている植物種にのみ適用可能である、2)プロトブ するので、それに伴う培養変異の頻度が高くなり、正常 の方法は、1)ブロトブラストからの個体再生系が確立 な形質転換体を得る確率が低くなる、という問題点を有 al.,1989;Science240:204-207) 。 しかしながち、C よりDNAを細胞内に導入し、形質転換を図る方法であ

RC法は、目的遺伝子とブロトブラストとを混合し、P 換体を得た報告はあるものの、広く用いられているとは レーション法と同様な問題点を持つ(Zhang W.et al.,1 988; Theor. Appl. Genet. 76:835 - 840, Datta S.K. et al., **宮い難い。 ブロトブラストを用いるため、エレクトロボ** ECで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であ 生よりはいくふん低いと考えられる。この方法で形質転 わった点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション り、エレクトロポレーション法とは紀気刺激が氏のC数 1990; Bio/Technol.8:736-740) .

されていない植物種に有効である。形質転換効率は、遺 パーティクルガン法は、目的の遺伝子を後細な金属粒 ち込むことによって形質転換を行わせる方法である。従 って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行う ことができ、特に、プロトブラストからの再生系が確立 子に付着させ、金属粒子を高速で細胞あるいは組織に打

- ション法と効率を比較したデータはない(Cordon – Ka et al.,1990;Bio/Technol.8:833-839,Christou P.et a mm W.J.et al., 1990; Plant Cell2:603-618, Fromm M.E. 伝子を打ち込んだ後の遺抜に依存する。 エレクトロボレ 1.,1991;Bio/Technol.9:957-962) .

策 (Topfer R.et al.,1989;Plant Cell1:133—139,Ledo ux L.et al.,1974Nature249:17-21)、2)花粉管への その他の方法としては、1)種子、胚とDNeの共存培 処理 (Luo and Wu1988;Plant Mol.Biol.Rop.6:165

-)、3) リボソーム法 (Caboche M.1990;Physiol.Pla 4) マイクロインジェクション法 (Nouhaus G.et al.,1 987;Theor.Appl.Genet.75:30-36) があるが、形質転換 の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、 一般的な方法とは含い難い。 2

寄生しないとされている (De Cleene M.1976;Bot.Rev.4 相図の宿主は双子菜植物のみに限られ、甲子菜植物には 一方、アグロバクテリウム威笛紐のLiグシスミドやく クターとして用いた遺伝子導人法は、タバコ、ペチュニ ア、ナタネ等の双子葉作物の形質転換法として登過的に 用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム国 2:389~466) 2

してはアスパラガス (Bytchier B.et al.,1987:Proc.Na tl.Acad.Sci.USA:84:5345-5349)、そしてヤム (Diosc orea bulbifera) (Schaferw, et al., 1987; Nature 327:5 特にイネ科作物にはこの方法を適用できないとされてい アグロバクテリウムによる単子鉄値物の形質転換に関 29-532) で報告されているが、その他の単子萊植物、 5 (Potrykus 1.1990;Bio/Technol.8:535-543)

上の観察結果はアグロバクテリウムがトウモロコシKDM Grimsley et al,1987:Nature325:177—179477 94711 る。しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込まれなくても 組み込まれたことを示すものではない。その後、磁染効 串はトウモロコシの茎頂の生長点に接種した時が最も高 遺伝子が必須であることを示した(Grinsley et al.,Mo トウモロコシの生長点に接種したところ、トウモロコシ ストリークウイルスの風染を暗認したことを報告してい 9) 取扱にはアグロスケテックムのブルスミドのえん クテリウムのT-DNAの中にトウモロコシストリークウ イルス (Maize streak virus) のDNAを抑入したものを る。トウモロコシストリークウイルスのDNAを接種した だけではこのような感染症状が因められないことから、 **|冷導入することができることを示すものと解釈してい** 均滑する可能性があるので、この結果はT – DNAが核に Crimsley et al., 1988; Bio/Technol.6:185-18 \$

はトウモロコンの基項に針で傷をつけた役カナッイシン テリウムEHAIを接種し、処理後の塞頂組織をカナマイシ Could J.et al. (1991; Plant Physiol.95:426-434) 抵抗性遺伝子とQS遺伝子を持った徴病原性アグロバク S

l.Cen.Cenet.217:309-316) .

るカルスが増殖したが、このカルスからの植物体の再生 はできなかった。また、カナマイシン抵抗性遺伝子の存 Mooney P.A.et al., (1991; Plant Cell, Tissue, Organ た。まず、胚を酵素で処理し、細胞壁に傷をつける処理 をし、その後アグロバクテリウムを接倒した。処団した カルスのうち結めて少数のカナマイシン抵抗性と思われ 在をサザン分析で確認したところ、全ての抵抗性カルス Culture25:209-218) は、アグロバクテリウムを用い て小変の胚にカナマイシン抵抗性遺伝子の導入を試み で導入遺伝子の構造変異が見られた。

日本時、藤坂5号の2品種で暗璃状の組織の増殖が見ら **ネの胚盤に格をつけた後、強病原性のアグロバクテリウ** 子を抑入したブラスミドを持つアグロバクテリウムをイ **ネの胚に接種したところカナマイシン抵抗性カルスの増** が認められたが、形質転換値物を得ることはできなかっ た。これらのことから、アグロバクデリウムのT-DNA たTiプラスミドにカナマイシン抵抗性遺伝子とGIS遺伝 随が見られた。この抵抗性カルスではCIS遺伝子の発現 Raineri et al. (1990;Bio/Technol.8:33-38) 114 わた。さらに、T-DMからホルモン合成遺伝子を除い AA281 (pTi8o542)をイネの8品機に処理したところ、 ゲイネ価的に導入されたと解釈している。

ついても完全に説得できる枯果を示しているとは含い難 しかし、生民点を単値する作数は多くの労力を要し、大 このように、イネ、トウモロコシ、コムギ苺のイネ科 の作物でもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が可能 であることを示唆する研究報告が現れてきているが、ま エレクトロボフーション法が主流であるが、プロトグラ **多大な労力がかかり、また長期間の培養により高頻度で 変異体が出現するという危険性がある。また、この方法** はプロトゾラストからの再分化系が確立されていない作 効、例えばトウモロコンには適用できない。そこで、上 心のように、トウモロコシに対しては、生長点組織を用 **だ、神現性、導人効率、さらには遺伝子の導人の確認に** ストを用いるため、再生植物を得るまで長期間を費し、 いることが試みられている (Could J.et al.,1991). 上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、 (Potrykus I.1990; Bio/Technol. 8: 535 - 543) **型に調製することは必ずしも容易ではない。** 従って、本発明の目的は、従来の方法に比較して、形 質核数から植物体の再生までの時間が陷く、プロトブラ ストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対 しても普通的に適用することができ、さらに用いる材料 の調製が容易な単子菜植物の形質転換方法を提供するこ

ន 本即発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子

イナリーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影 響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の培養組織をアグ ロバクテリウム属細菌を用いて飛躍的に高い効率で再現 れによれば上記目的を達成することができることを見出 葉の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及びバ 性をもって形質転換することができることを見出し、こ ひ、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロ パクテリウム属細菌で単子集植物の既分化過程にある培

養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物に目的 なった。アグロパクテリウムを用いた単子葉植物の形質 転換方法はこれまでにもあるが、前述のとおり確立され 調製が容易なカルス等の培養組織を用いるので、生長点 を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得ることが ラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時 に、適切な接種後の選抜法を採用すれば、目的遺伝子が た方法とは言い難い。しかし、本発明ではこれまでに用 いられていない培養組織に本発明で改良した方法でアグ ロバクテリウムを接種することにより、極めて容易に遺 できる。また、培養組織を形質転換するので、プロトブ ナリーベクターを用いれば、一部のイネの品種のように が可能になった。さらに、後述の実施例に記載するよう キメラ状に導入されるキメラ現象を低減させることもで の外来遺伝子を再現性良く導入することが切めて可能に 伝子を導入することができた。本発明の方法では、材料 間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーパイ 培養が困難な品種にも高い効率で遺伝子を導入するとと 本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、 成る、単子英植物の形質転換方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法に用いることができるアグロバ クテリウム属細菌に含まれるブラスミドの一例であるpT CK1GZの構造と本発明の実施例で用いたブラスミドpTOK2 32の構築方法を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特 に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオ ムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子禁値 物にも適用可能である。

\$

ルス及び不定胚様組織が形成される前段階の組織を意味 また、本発明の方法に供される培養組織は、単子薬植 物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織 である。ととで、既分化過程にある培養組織とは、外値 片をオーキシン及びサイトカイニン等の植物生長調節物 質を含む培地で培養することにより得られる組織で、カ し、脱分化した培養組織とは外値片をオーキシン及びサ イトカイニン等の植物生長興節物質を含む培地で培養す ることにより得られるカルス及び不定胚様組織を意味す

る。本発明で用いられる培養組織はいかなる部位由来の 明で用いられる培養組織としては、既分化既導培地に外 植片を留床した後7日以上経過したカルス形成過程にあ 機として用いることが最も好ましい。脱分化路導培地は g/l 2,4-D、1g/lカザミノ酸、30g/lショ塩、2g/ゲル ライトを添加した培地及びLS倍地(Linsmaier, E., and S lood, F.1965; Physio]. Plant18:100-127)の無機塩及び 加した培地等を用いることができる。もっとも、本発明 ものであってもよく、例えば、胚盤、茎頂、幼根、未热 胚、花粉及び葯由来のものを挙げることができる。本発 が好ましい。中でも、カルス及び不定胚様組織を培養組 この分野において周知であり、例えばNG音曲 (Chu.C.C. 1987; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press アタミン類に100mg//カザミノ製、700mg//プロリン、1. の方法に用いる培養組織は必ずしもカルスである必要は る培養組織、又はカルス及び不定胚様組織を用いること Smg/l 2,4-D、20g/lショ樹、2.3g/lゲルライトを添 なく、筋質値的であってもよい。

al.,1984;Bio/Technol.2:702-709,Hood E.E.et al.,19 6;J.Bacterio].166:88-94,Jin S.et al.,1987;J.Bacte ター(本明細母において、このベクターを「スーパーパ イナリーベクター」と呼ぶことがある)を開発した(特 開平4-222527号)。 このようなスーパーパイナリーベ スミド中に存在し、相同組換え等によりTiブラスミド中 らば、先に、Agrobacterium tumefaciens A281という協 riol.169:4417-4425, Komari T.1989; Plant Science60: (Jin S.et al.,1987:J.Bacteriol.169:4417-4425) Ø 用いることができる。これちのものの多くはAgrobacter 数(xin質数)由来のDMa質数を含むくクターを有してお り、植物に付与しようとする形質を担う遺伝子はこのく クター中に挿入されるか又はこのベクターとは別のブラ 成原性の、形質転換効率が極めて高い体(Hood E.E.et 86; J. Bacteriol. 168: 1283 — 1290, Komari T. et al., 198 ジェラフンス館及(vi を数)由米のDNA競扱の名かく 従来より双子葉植物の形質転換に用いられているものを 形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、 ium tumefacions由来のTiブラスミドのヴィルレンス製 223-229ATCC37394) 化合まれるTiプラスミドpTiBo542 にin vivoで抑入されるものである。また、本観発明者 クターを本発明において好ましく用いることができる。

及びAgrobacterium tumefaciens中で増発可能であるpTO T領域を含むプラスミド)にpTiBo542のヴィルレンス倒 このようなスーパーパイナリーベクターの例として ロ る。その構造を図1に示す。このブラスミドは、大助商 QS4と呼ばれるブラスミド(Tiブラスミドから骸導され **号、米国特許出馭第07/824,804号)を挙げることができ** た公知のpcw7プラスミドとpvck101と呼ばれる公知の 広宿主域ブラスミドから後述の方法により構築された、 OK162 (特開平4-222527号、欧州特許公開第504869

境界配列とその間に単子菜植物に導入しようとする遺伝 子としてカナマイシン配性遺伝子が配列されており、こ の例は、単子葉植物に導入しようとする遺伝子がpTiBos を含有するブラスミド上に配置されている例である。な 数由来の既にクローン化されていた上記15.2キロベース のkpul断片(xing、xing、xing治道伝子を含む)を組み 込んだものである。このpiocus4cは、丁寅城の2つの 42のグィルレンス図数由来のクローン代されたCNA断片 お、図1中の各符号は次の意味を有する。

特許2649287

€

9 スペクチノレイシン抵抗性遺伝子 ド ハイグロシイツン抵抗体遺伝子 ₩T カナレイツン既抗性適化子

に テトラサイクリン抵抗性遺伝子

IC イントロンONS調化子

T-DNAの右ボーダー配列 T-DWの左ボーダー配列 ᇏ

vir8,C,G 数屏原性アグロバクテリウムA281由来のvir 10 E

ORI COLE1の複製開始点

制限群素Kpn I部位

の5 シムダファージのCOS単位

制取群素Hind III邮位

プラスミドの下領域中の制取群群部位に依法により組み 込むことができ、ブラスミドが有する緊和耐性等の適当 な強択マーカーに基づいて選択することができる。もっ 単子禁値物に組み込もうとする所質の遺伝子は、上記 部位を持つものは、通路のサブクローニングの手法では とも、図1K示すpTOKIG2のように、大型で多数の何限 所型のDwをT領域内に導入することが必ずしも容易で

はないことがある。このような場合には、Agrobacteriu m tumefaciens細胞内のin vivo系での相同組換え(Herr era-Estrella L.et al.,1983;EMBO J.2:987-995,Hors ことにより、目的のDNAをplOKIG2に導入することが可能 Kなる。すなわち、例えば、先ず、pIOKIGZをAgrobacte ブラスミドを含む)を導入する。pickaのOuwkにはpBR3 ch R.H.et al.,1984;Science223:496-498) を利用する rium tumefaciens仏学入しておいて、ての弦ださらた所 22と相同な部分があるので、pBR322務導体は相同配列を 望DNAを導入したpBR322と呼ばれるブラスミド(類似の 介した組み換えによりpTOQGに組み込まれることにな **\$**

る。pBR322はなTOK162と異なりAgrobacterium tumefacie ができる。さらに、pTOKI62を有するAgrobacterium tum rs中では複製できないので、このような組み込まれた状 徴(pTCK162::p8R322数導体という)でなければAgrobac terium tumefacions中で生存することができない。そし (集剤耐性等) について選抜すれば、p10K162::pBK322 て、pTOKIG2とpBR322誘導体のそれぞれに特異的な特性 務等体を有するAgrobacterium tumefaciensを得ること efactonsに各種のプラスミドを導入して研究したとこ

ろ、p8R322誘導体の選抜マーカーとしては、トランスポ 8

質転換した場合、両丁質域とも導入される場合も相当の 比率で生じるわけであるので、目的遺伝子の導入は十分 速成できる。また、両T領域が別々の染色体に組み込ま れる場合もあり得るので、後に目的の遺伝子をカナマイ 子と所望の遺伝子を別々のT領域中に配置することも可 **能である。カナフインン耐性をマーカーとして値物を形** syの相同組換えにより、pidc162のT領域に所望の遺伝 子を導入することができる。またその他の場合には、pB 用意しておいて、これに所望の遺伝子を挿入する方法も //y_In/ (De Greve H.H.et al.,1981;Plasmid6;235-24 のブラスミドに挿入すれば、Agrobaoterium tumefacien 最終的に、pTOKIG上において、カナマイシン団性遺伝 pB332にクローン化されている場合には、SP遺伝子をそ 考えられる。この際、丁領域の境界配列を活用すれば、 ていることが判明した。従って、すでに所望の遺伝子が R221由来のDNAと SP遺伝子から構成されるプラスミドを 8) 由来のスペクチノマインン耐性遺伝子 (SP) が優れ

限定されるものではなく、望まれる性質を付与すること かできるあらゆる遺伝子が包含される。例えば、除草剤 抵抗性遺伝子、抗生物質抵抗性遺伝子、ウイルス病抵抗 性を付与するためのウイルスのコート蛋白質遺伝子及び 単子繁値物に導入しようとする所望の遺伝子は、何ち 紅乳の政的形質関連遺伝子などを挙げることができる シン併性遺伝子から分解することも可能となる。

右主となるアグロバクテリウム属和菌としては、特に 限定されないが、Agrobacterium tumefaciensを好まし が、もちろんこれらに限定されるものではない。 く用いることができる。

パクテリウム両細菌に導入する操作は従来法により行う 30 ことができ、例えば、相函の三系交雑手法(Ditta G.et al.,1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA77:7347 – 7351) {C プラスミドをAgrobacterium tumefaciens等のアグロ より行うことができる。

このようにして割裂されるアグロバクテリウム属相函 には、plok162由来のヴィルレンス能力の高いDNAが含ま れるので、高い効率で単子薬植物の形質転換を行うこと

に危険されるものであるが、アグロバクテリウム原相菌 尚、本発明においては、単子葉植物に導入しようとす る遺伝子は、従来の技術と同様にT蝦城の境界配列の間 中で、ガブラスミド上に配置されてもよく又は他のブラ が回館である。

\$

の培養液中にアグロバクテリウム原細菌を認加して共存 リウム原細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に培養組織 を3~10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培登 することにより行うことができる。あるいは、培養組織 アガロバクテリウム属細菌で単子葉植物の培養組織を 形質転換する方法は、培養組織をアグロバクテリウム腐 細菌と単に接触させることにより行うことができる。例 えば、10~10~相胞/m/程度の細胞線度のアグロバクテ スミド上に配置されてもよい。

ように、本発明の方法では、培養組織を酵素処理や傷つ 倍殺することにより形質転換を行うこともできる。この ける等の前処理を行わずに形質転換に供することができ

グロマイシン等の選抜マーカー及びアグロバクテリウム 原細菌に対する抗生物質を添加した培地で培養すること 形質転換に供試した培養組織は、その後、既分化過程 又は散分化状態で形質転換細胞又は形質転換組織を選抜 ン、サイトカイニン等の植物生長調節物質を含み、ハイ することが好ましい。これは当政培養組織をオーキン により行うことができる.

る。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるもので を行うことができる。これにより、形質転換により所望 選抜した細胞又は組織は公知の方法により再分化培養 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明す の形質を獲得した植物体を再生することができる。

実施例]

(1)供試培養組織の調製

日本福品種、朝の光、月の光及びコシヒカリを遺定し (i) イネの品種 2

イネの完熟量子を70%エタノールに1分間、1%次亜 (ii) 胚盤、胚盤カルス た供試した.

した後、2NG固体培地(NGの無機塩類及びピタミン類(C hu C.C.1978; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science また、完熟種子を選床後4日目に程子より胚盤部位を摘 塩素酸ナトリウム3に0分間浸漬することによって消費 形成された胚盤由来のカルスを2NG培塩に移植し、4~ Press Peking,pp.43-50)、1g/1カザミノ散、2mg/1 2,4- D、30g/1ショ链、2g/1ゲルライト)に置床した。 出し胚盤として供試した。完熟電子を約3週間培養後、 7 日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

(iii) 基顶組織

イト)に置床し、培養3日後の幼苗から、頂端分裂組織 イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2MG タミン類、1g/1カザミノ酸、20g/1ショ糖、2g/1ゲルラ 体培地(1/2量のN6の主要無機塩類及び液量塩類、N6ビ を含む2~3mの組織を切り出し、材料とした。

5~10mm切り出して材料とした。また、これらの幼根を 2N6固体培恤上で約2週間培養して得たカルスを幼根カ (iii) の方法で得た幼植物体から種子根の先端部を (iv) 幼根組織、幼根カルス

ルスとして用いた。

(v) 聚氮培養細胞

473-497)、0.5g/1カザミノ酸、1mg/1 2,4-D、0.2m 量值類(Murashige and Skoog 1962;Physiol.Plant,15: (A主要無機塩類、A7ミノ酸及びANビタミン類(Tori yama and Hinata1985;Plant Science41:179-183,MG類 (ii) の方法で得た胚盤由来のカルスをAA液体培地 S

移し、25°C、暗黒下で120rpmで振盪することによって懸 衛培養細胞を得た。なお、培地の更新は1週間毎に行っ g/カイネチン、0.1mg//ジベレリン、20g//ショ鶴)に

グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子をいプラスミドのT-D ロンを含むGS遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝 子と連結したブラスミド (中村ら、1991;植物パイオテ クノロジーII(現代化学増刊、pp.123-132)、名古屋 ハイガロマイシン抵抗性遺伝子 (HPT) 及びB-D-(i) pIGI211m:ヒマのカタラーゼ遺伝子の第1イント W領域に組み込んだ、以下のブラスミドを作製した。 (2) ガブラスミド (パイナリーベクター) 大学、中村氏より入手)。

1.イントロンGNS及びハイグロマイシン抵抗性遺伝子の 中間ベクターpT0/Q29への導入 (ii) pT0lQ32:

びスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つブラスミドロ Tn7由来のスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含むCla し、これをdC19のSma 1部位に挿入し、アンピッシン及 処理し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む2.5kb 断片をpca482のEcoR I. Hind III断片 (2.7kb) と連結 し、スペクチノマイシン低抗性遺伝子とHind III、tha OCLO7(5.214)を得た。pTOKOO7をEcoR I, Hind IIIで 1断片 (2.5㎞) をクレノー処理により末端を平滑化 I部位を含むpTOK170 (5.2kb)を得た。

(7.6仏) を得た。なお、pGLZはpDH51 (Pietrazak et a イグロマイシン抵抗性遺伝子 (Gritz L.and Davis J.19 プラスミドpGL2 (J.Paszkowski,Friedrich Mieocher In をtpa 1処理して得られた断片をpG.2-IGのPw II断片 末端を平滑(むし Hind IIIリンカー (pCAACCTIC;タカラ酒 ロモーターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を連結した 83;Gene25:179-188) の抑入したものである。 pTOGL70 造コード4660P) を挿入した。355プロモーター及びイン トロンQDを含む断片をHind IIIにより切り出し、355プ 1.,1986;Nucleic Acids Research14:5857—5868) 12.7 ンとGIS遺伝子を連結したベクターpIG21 (Ohta S.et a 中村氏より譲渡)をEcok Iで切断後クレノー酵業により 355プロモーターにヒマのカタラーゼの第1イントロ 1.,1990;Plant Cell Physiol.31:805-813,名古国大学 stituteより入手)のHind III部位に挿入しpG.2-1G (5.21d) と連結しpTOK229 (10.11d) を得た。

両プラスミドの組換えによって生じたプラスミドのみが スペクチノマイシン、カナマイシンで選抜された歯には パイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムA2 81田来の51氏、51元、51元遺伝子を神入して得たスーパ 人は相同組換えによって行った。 すなわち、 両ペクター ーパイナリーペクターpTOCLG2への目的遺伝子 (ハイグ ロシイツン抵抗性遺伝子、イントロンGA遺伝子)の導 は大脚菌ブラスミドpBR322に由来する部位を持つので、 2) スーパーパイナリーベクターpTOKIGSへの導入

特許2849287

9

含まれることになる。スーパーパイナリーベクターだい イグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンのK遺伝子が 組み込まれたプラスミドをpTO/232と呼ぶ (図1登

(3) 沓主アグロバクテリウム

スミド (vi 個域を完全な形で持つ) PAL4404を付する箇 T - DNG域を削除した図系、LBA4604とEIA101とを寄 ミドのvir似域が強角原性アグロバクテリウムA28ub来 茶であり、American Type Culture Collectionより入手 可能である (ATCC 37349) . EM3101はヘルバーブラス 主バクテリアとして使用した。LBM40dはヘルバーブラ であり、Hood E.E.et al.1986から入手可能である。

tta G.et al.1980; Proc.Natl.Acad.Sci.USA77;7347-73 伝子導入用として用いた。 これらのブラスミドをアグロ パクテリウムに導入する方法は細菌の三系交雑手法 (Di 2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の箇系を遺 (2) 項で述べた種々のパイナリーベクターをこれら

LBA4404 (pTOK232) 51) によった。

LBA4404 (pIG1211th) EHA101 (pIGLZ1HM) 2

2M、グルコースを0.2MC変更し、アセトシリンゴンを10 g/ml)を含むA的各類(Drlica K.A.and Kado C.I.1974;P とり、修正AA指題(街送のAA倍増において、ショ館をO. roc.Nat1 Acad.Sci.USA71:3677-3681) 上で3~10日間 培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかき On M符首、At2.5) 不難終し、経過何多3~5×19 苗 ハイグロマイシン(2049年) とカナマイシン(504 (4) アグロバクテリウム胚剤液の調製

粒/mlに調整し接種に用いた。 (5) 旋髓条件

のセフォクキシムを含むそれぞれの固体培地で培養を捻 1ンョ哲を含むNGS3固体语地(1/2NG正要無機相類、NGX 桐油館、N6パタミン館、Gru C.C.1978、A7ミノ殿(To riyama and Hinata1985),14/1ガザミノ鼠、0.2mg/1 NA A 1.0mg/カイネチン、3d/ゲルライト)に、胚盤カル スなどのその色の沿途組織はアセトシリンゴン、グルコ ース、ショ館を同議度で含む2NG固体培地に移植し、25 ·C、暗黒下で2~5日間培養した。その後、接種組織を 250mg/1セフォタキシムを含む協協水で洗浄し、同協度 数は100μMアセトシリンゴン、10g//グルコース、20g/ 供試組織を顧望水で洗浄後、上述のアグロバクテリウ 4の慰園後で3~10年間改設した。改改的開後、諸田相

(6) cusi舌性の調査方法

躍した。リン酸極衝液でアグロバクテリウムを洗浄除去 共存培養処理直後、組織を0.1%Triton x-100を含む した後、0.1mm 5ープロモー4ークロロー3ーインド so リルーβーD-グルコン酸(X-gluc)及び20%メタノ 0.1Mリン製機管液 (atp.8) た改設つ、37Cかー時国都

−ルを合むリン観報衝浪を添加した。37Cで24時間処理 した後、背色の星色を示す組織を顕微鏡下で観察し、供 試組織数に対する百分率で扱した。なお、選抜処理後得 **蛇に帰しては、植物体から蒸片を採取し、回様な方法に** 全体又は萊片の切り口が一様に青色に星色するものを開 られた形質転換体と考えられる植物体でのdigis性の判 従ってGLS数色を行った。個体Cとの発現様式で、葉片 性個体、キメラ状に显色するものをキメラ個体とした。

(1) 形質転換相数、組織の遺抜 (1) 迷点粗糙

5 日間アグロバクテリウムと共存培費した茎頂組織を し、生長した茎頂組織を40mg/1ハイグロマイシンを含む 250mg/1セフォタキシムを含むN6S3培地で2週間培養 v6S対合地に移して、形質転換体の選抜を行った。

3 日間共存培養した配盤を250mg/1セフォタキシムを sto 2NS倍地で1週間培養した後、50mg/Jハイグロマイ ソンを含む2NG倍地で形質転換細胞の遊抜を行った。

(iii) 培養組織(胚盤カルス)

b個体再生用培地NG33C移した。なお、共存培養後の培 ンムを含む2NG倍地で1週間培養した後、同培養組織を5 シンを合むNS-12倍冶(NS無磁塩類、N6ピタミン類、2g イト)で2~3週間培養し(2次道抜)、この培地上で Ded/ICイグロシイツンを包むSNG信泊で3週間結婚した ハイグロマイシン低抗性の培養組織を選抜した(1次達) 抜)。得られた抵抗性組織をさらにSOmg/1ハイグロマイ 都路したカルスをO. 20、SOmd/1ハイグロマイシンを含 ハカザミノ酸、0.2mg/12,4-D、0.5mg/1 6BA 5mg/1 3日間共存培費した培養組織を、250mg/1セフォタキ ABA、30g//ンがだトール、20g//ショ語、2g//ゲラル 塩には全て250mg/1セフォタキシムを添加した。

(iv) 弱离布做苗园

5 日間共存培養した懸囂培養細胞を250mg/1セフォタ キシムを含む2NG倍指で1週間倍限した後、SOmg/1ハイ グロマイシンを合むZwd台地で形型転換価数の過抜を行

(8)形閣転換次世代における導入遺伝子の発現

形質転換次世代の種子を70mg/ハイグロマイシンを含 5関転換次世代の様子を各20位づつ福曜し、約3週間後 D400倍ホーマイ水和剤水溶液中に指揮後、25℃で10日 間処理し、ハイグロマイシン抵抗性を調査した。また、 の苗から塔片を採取し、QK遺伝子の発現を調査した。

수

(9) サザン法による導入遺伝子の分析

品種、朝の光、月の光の形質転換体当代について、小 中の及さは、約5.5kbであり、この領域のT - DNAの内部 聞らの方法(Komari et al.,1989;Theoretical and App したOWAC制限酵素Hind 111を処理し、HPT遺伝子をプロ ied Cenetics77:547-552) に従いDNAを抽出し、抽出 ーブとし、サザン法による導入遺伝子の検出を行った。 パイナリーブラスミド上のHPT遺伝子を含むHind III断

法に従って行った。また、"月の光"の形質転換次世代 の2 系統について、austa在、austa在、ハイグロマイジ ン抵抗性の各個体を2個体づつ供試し、同様な手法によ 法についてはMolecular Cloning (Sambrook et al.198 のHind IIIサイトからしボーダー配列の末端までのDNA 頃域の長さは、約5.440である (図1)。 なね、サザン 9;Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載の方 りサザン分析を行った。

(10) イネでの供試材料の違いによる遺伝子導入効率

入することが可能であることを確認するため、強病原性 クターpIG121hm (上述) を導入した菌をイネ品種月の光 ルス及び懸濁培養細胞である。アグロバクテリウムで処 **ウムEHA101 (pICL21hm) で処理した場合には、幼根を除** 盤カルスが優れていた。胚盤カルスに次いで高い導入率 を示した組織は茎頂であった。また、胚盤の脱分化組織 である胚盤カルスおよび懸菌培養細胞で高い導入率を示 を示すものは認められなかった。一方、アグロバクテリ **ず色を呈する組織の割合では胚盤カルスが最も高かった** このことは、より細胞分裂の活性が高い組織に遺伝子が アグロバクテリウムが単子葉作物の細胞に遺伝子を導 た。供試組織は茎頂、幼根、胚盤、幼根カルス、胚盤カ く組織でGLSの発現が確認された。処理組織数に対する のvir威域を持つアグロバクテリウムEHA101にハイグロ レイシン抵抗性遺伝子 Fass遺伝子を持つスイナリー人 理しなかった場合は、いずれの材料でも背色のdus発現 (表1)。さらに、auxを発現する組織の大きさでも胚 したのに対し、胚盤では明らかに導入効率は低かった。 の種々の組織に処理し、共存培養後にQIS活性を調査し 導入されやすいことを示唆するものである。 (共存培養後におけるQuS発現) 20

表1 供試材料の違いによる CLS遺伝子の導入効率

供权組織	(IS+の組 機能(%)	JLS+の組織数/処理組織数(%)	の 本本 を の の は が が が が が が が が が が が が が が が が が
	对耐吸料	双亚级	大きさ
工工	(0)0£/0	(69),191/601	#
幼根	0/20(0)	0)06/0	
幼根カルス	(0)08/0	24/115(21)	+
压器	0/20(0)	(6)69/8	+
胚盤カルス	0/141(0)	312/395(79)	#
服務格数值图	(0)252/0	61/247(25)	#

+:1%以下, #:1~10%, #:10%以上

入されているため、アグロバクテリウムの細胞の中では この実験で使用したパイナリーベクターpIGIZ1hmでは DIS製衍子のプロモーターの中次 F トのイントロンが替 ら、1991)。以上のことから、共存培養後のQK遺伝子 as遺伝子は免現しないことが確認されている(中村

S

€

の発現を指標とした場合、アグロバクテリウムはイネ細 的に遺伝子を導入できることが確認された。

(11) 供試材料の通いパイる形質転換組織および細胞の

基園培養細胞を用いて、ハイグロマイシンによる形質転 胚盤カルスおよび懸顔 拾袋植物で ハイグロマイツン 花紙 る。また、生長点近傍に遺伝子が導入され形質転換細胞 共存培養処理を行った茎頂、胚盤、胚盤カルスおよび 全ての組織が枯死し、抵抗性組織は得られなかった。茎 頂は生長点を含む組織であるが、遺伝子の導入処理を行 った後、抵抗性組織が増殖するためには、遺伝子が限ち れた生長点に導入される必要がある。アグロバクテリウ 可能性が高いことは容易に推測される。これらのことか 方法に比べ、技術的な困難性が高く、再現性の低い手法 ムとの共存培養処理後、茎頂には多数の遺伝子が導入さ **たているものの抵抗性組織が得られなかったことは、生** 長点近傍に導入される確率が低いことによると考えられ ち、Gould et al. (1991) により報告されている室頂を 用いた形質転換方法は、カルスなど脱分化組織を用いる が得られたとしても、得られる植物体がキメラ性を示す **行性を示す形質転換細胞の増殖が認められた(表2)。** 共存培養後、CUS発現の調査で高い遺伝子導入効率を示 換組機および形質転換細胞の選抜を行った。その結果、 また選抜された細胞は、QNS遺伝子を一様に発現した。 した茎頂組織は、ハイグロマイシンによる選抜の結果 であると考えられる。

数では抵抗性細胞の増殖は認められなかった。また、Ra や影像や数価的で形質転換価的が得られたのに対し、形 ineri et al. (1990) の方法に従い、傷をつけた胚盤を 完熟種子の胚盤に由来する培養組織である胚盤カルス 供試組織として遺伝子導入を試みたが、遺伝子導入効率 の向上はみられず、形質転換細胞も得られなかった。こ つけるなどの処理も必要なく、再現性良く、しかも高頻 度で形質転換細胞が得られた。これらのことから、アグ ロバクテリウムによる形質転換の供試組織として、脱分 れに対し、胚盤カルスを供試組織とした場合には、傷を 化状態または脱分化過程にある培養組織が好過であると

特許2649287 会質ななの過いによる形質 転換組織および細胞の出現 効率(品種:月の光) 表2

供試品籍	ハイグロレイツン 理組織数(%)	ハイグロマイシン抵抗性組織数/処 理組織数(%)
	類如即区	数即区
五五	(0)02./0	(0)22/0
K.	0/30(0)	0/128(0)
胚盤カルス	0/20(0)	169/743(23)
原因布教植物	0/220(0)	22/254(8)

四 イネの品種による遺伝子導入効率の違い(共存 **柘衆後におけるGIS発現)**

方、前項で用いた月の光は比較的培養が容易である。ア グロバクテリウムによる形質転換法を用いる場合、この の点を明らかにするため、コシヒカリと月の光の培養容 **易性の異なる2品種を用いてアグロバクテリウムによる** 遺伝子導入効率の差異を調査した。供試組織は胚盤カル **冶養細胞の確立、培養細胞から個体再生に関しては大** 8;Plant Cell Tissue Organ Cult.12:311-314),日本 ような品種間差異があると実用的には不都合である。こ きな品種間差異が存在する(Nikami and Kinoshita198 スとし、アグロバクテリウムとしてはEM101(pJG121H 幅の中ではコンヒカリは培養が困難とされている。一 m) 及びLB4404 (pIG1211m) を用いた。 2

性が認められたが、コンヒカリではこれより低い事での S古性が認められた (表3)。従って、EM101 (piGL21H m) あるいはLBA4404 (pIG1211m) を用いた場合には、導 月の光では各実験を通じて90%以上のカルスでの16活 入効率に関する品種間差異があるものと解釈される。

扱3 アグロハクテリウムの国 SGIS遺伝子の導入効率

		CLS+O#	GE+の組織数/包囲組織数(%)	数数(%)
			迷园	
野盟	栄験	LBA4404 (p1G121Hs)	EHA101 (p1G121Ha)	LBA4404 (pTGK232)
月の光	1	(96)01/19	78/87(90)	64/66(97)
月の米	2	72/86(84)	68/73(83)	82/82(100)
コジヒカリ	7	46/135(34)	46/135(34) 43/116(37) 124/131(95)	124/131(95)
コジド	2	28/107(26) 81/143(57) 102/103(99)	81/143(57)	102/103(99)

\$

(13) アグロバクテリウムの国系による遺伝子導入効率 の違い(共存治験後におけるCLS発現) EIMIOI (pIC1211m) はヘルバーブラスミドに徴劇原性 アグロバクテリウムA281のVir微塩を持つ。LBM40M (pI 20 GI211年)は通体のAr 色数を持つ。 一方、CR4404(plok

6

特許2848287

アグロバクテリウムの脳 系の違いによる形質転換 効率の違い(胚盤カルス) X

パイナリーベクターはpTOK1Gから派生したもので、LBA

40A(pTOK162)は双子葉作物の中でも形質転換の困難

が、パイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウム

232) はヘルパーブラスミドのvir級域は通常型である

ASEONに放送の一部の運行子を泊する。 そした、この

f.et al., 1992; Theor. Appl. Genet. 83:679−683) . ∠Ø

ように、始府原住のvir函数の存在そのもの、あるいは

な植物種に極めて商率で形質転換を可能とした(Saito

存在形態は形質変換の効率に大きく影響する可能性があ る。そこで、強病原性のvir遺伝子に関して異なる上記 8.現に関する導入効率を比較した。 なお、供試材料はコ 資房原性のvin超域を持たないLBA4404(pIG1211m)で ヒカリではその単は30%程度と低かった。 ヘルパーブラ コシヒカリの導人路はやや上昇した。パイナリーベクタ

の3 種類のアグロバクテリウムを用いて、GUS遺伝子の

ンヒカリ、月の光の阻撃カルスである。

		ハイグロマー理カルス数(ペイグロマイジン抵抗性カルス数人処理カルス数(%)	カルス数/処
			採	
品種	影響	LBA4404 (p IG1211ha)	EM101 (p i G121Ka)	LBM4104 (pTORZZZ)
月の光	-	(12)802/16	139/301(46) 169/305(55)	169/305(55)
月の光	2	59/421(14)	68/425(16)	68/425(16) 110/360(31)
月の光	က		10/521(2)	174/644(27)
月の光	*		20/349(8)	100/349(29)
コシヒカリ	-	(2)892/9		65/283(23)

(15) ハイグロマイシン耐性形質転換体におけるQLS通

スミドに徴仮原住のvirを持つEM101(pIG121hm)では

も国品組ともGNS岩柱を示す組織が認められたが、コツ

用の倍増M6S3に、イグロマイツンを溶加した区と無溶加 た。しかし、再分化培地にハイグロマイシンを添加した 仰られなかった。 従って、このようなハイグロマイシン 場合はこのような個体は大幅に減少し、個体全体でのS このようにして得られた抵抗性カルスをさらに2次3 抜にかけ、抵抗性カルスから個体を再生させた。 再分1 の区を設定したが、無添加の場合には、CUSIS性がない 活性を示す再生個体が増加した(扱5、数6、数7)。 ハイグロマイシン抵抗性あるいはOS活性を示す個体は 抵抗性カルスから再生したCLS活性を全面に示す個体は なお、アグロバクテリウムで処理しなかった場合には、 個体あるいはキメラ状に活性を示す個体が多数出現し 形質転換体と考えられる。 8

の組織たの協句と数数の回復に関しては、LBA4404 (pTOK2

22) で最も大きく、高い導入率を示すことが観察され

図められた(表3)。さらに、GUS活性を示すそれぞれ

ヒカリでも月の光と同様に9%以上の組織でQUSE性が

- K 数数原紙のvirを持つLBM404 (p10k232) ではコツ

(14) 陌系の違いによる遺抜効率 (ハイグロマイシン耐 上項と同じ3つの箇系を用いて、月の光、コンヒカリ の胚盤カルスとの共存培袋後のハイグロマイシン抵抗性 カルスの遺抜率に関する比較を行った。抵抗性カルスの 住カルスの進抜率に関する品種間差異は認められなかっ た (長4)。LBA4404 (pIGIZUM) あるいはEHM101 (pIG 困難なコシヒカリではハイグロマイシン抵抗性カルスの 出現は2%程度にとどまった。従って、イネの形質転換 **と用いるアグロバクテリウムとしてはバイナリーベクタ**

表5 ハイグロマイシン抵抗性 カルスから再分化した植 物におけるGIS遺伝子の 発現(品種:朝の光)

出現率に関してはLBA4404 (pTOK232) が最も高く、抵抗

[21km] の2つの関系では、遊抜率は低く、さらに培養

ж.	路柱	0	0	
WALLE IN THE PASSES.	キメラ	1	-	
	安定的陽性	ĸ	1	
	III PP. CC	82	20	
1	V411	1	7	

- K 強角原性のvina 伝子の一部を持つLBA4404(pitoK23

2) が最も優れていると判定される。

かなが 本当知

(固体の再分化まで特地にはハイグロマイシンを添 包

우

ハイグロマイシン抵抗性 カルスから再分化した植 物におけるGLS遺伝子の 発現(品種:月の光) 9 #X

	**	A. BATERE .	
供权国系	供試ハイグロマ イシン抵抗性カ ルス	植物体再 生カルス	新华植物 体可SIN在
(#10101d) 1844404	3	1	1
EM 101 (p 1 G 1 2 1 Hbs)	a	11	2
13A4404 (9TDK232)	ន	15	12

(個体の再分化まで始地にハイグロマイツンを添加)

カルスから再分化した植 物におけるGIS遺伝子の ハイグロマイシン抵抗性 免現(品種:朝の光) 张

	*	糸配数		•
供試腦系	供試ヘイグロマイシン抵抗性カルス	植物体再 生カルス	用生植物 体CISIM性	
LBA404 (p1G121fm)	61	9	တ	
EHA101 (picizilla)	11	4	-	
(PTDK232)	19	Ξ	=	

(個体の用分化また体地にハイグロマイツンを浴垣)

16) 形質転換体の倍数性および種子総性

全く認められなかった。種子役性についても、一部に部 正常な生長を示し、外観から4倍体や奇形を示す個体は 分不給や完全不給を示す個体もみられたが、大部分の個 得られた形質転換体は、超室内で栽培することにより 体がほぼ正常な総性を示した。

(17) 形質転換当代ねよび次世代における導入遺伝子の 発現と分析

\$ 8 ことを示すものであり、植物体内でのパクテリアの残存 果、供試した全ての個体で1~数コピーの導入遺伝子の 体へ組み込まれたことを現付けるものである。なお、検 形質転換体の全DNAをHind IIIで切断したDNA断片に対 転換体当代における導入遺伝子の検出を行った。その結 中ではNFJ通伝子を含むHind III断片はS.SNDであるのに は、イネの染色体への遺伝子導入箇所がそれぞれ異なる して、HFJ遺伝子をプローブとしたサザン技により形質 存在が認められた (我8,我9)。 プラスミドpIOK232の 対し、供試したすくれの形態情数体には、約6kb以上の バンドが認められた。このことは、T-DNAが植物染色 出されたDNV断片の長さが個体で各々異なっていたこと

9

特許2849287

によるものではないことが確認された。

ないかもしくは発芽後の生長は着しく阻害された。これ 伝子の発現ともに1 因子分離にほば適合する遺伝的分離 な形で組み込まれたものと推測される。従って、この個 **7. 対し、形質情徴体からむのれた値子の多くは、正称な** の存在が描置されるが、サゲン解析の結果も2因子分離 本のパンドはSPGより短い断片であり、T-DMが不完全 体は次世代やにイグロマイシン抵抗性のついて1因子様 形質転換次世代個体のハイグロマイツン抵抗性を認益 したところ、対照品種の種子では、ほとんど発芽を示さ 8芽と生長を示した (表8,表8)。 また、これらのハイ 2ねよび3-2は、分離比から2因子以上の導入遺伝子 コピーの導入遺伝子の存在を確認したが、このうちの一 グロマイシン抵抗性個体は、GIS遺伝子の発現も認めら hた。多くの系統ではハイグロシイツン抵抗性、OAS通 を示した。数8における"朝の光"の形質転換系統1 に適合していた。数8の2-1の形質転換個体では、 の分類を示したものと考えられる。

有していたことは、同一の染色体または遺伝子座に複数 数9では"月の光"の形質転換米板の多くが、次世代 **これ1因子森の少籍を示した。 つむつ、当大のナナン**少 アー数を示した。形質転換当代のサザン分析により、導 くれの国体や、形質情被当代の国体と四一のメンドが数 次世代個体で、いずれも同一な2コピーの導入選択子を **所では一部の個体が1コピーであったほかは、複数のコ** 4 グロマイシン抵抗性の各個体を 2 個体 プロ供ばし、サ 出され、導入遺伝子が形質転換次世代に遺伝しているこ たくイグロレイツン抵抗権もよびONS遺伝子の名叫にし **入街位子が1コアーであった1884よび2コアーであっ** た16cの次世代2系統について、QKB位、QKB位、ハ ゲン分析を行った。その結果、CLS特性の個体を除くす とが示された。2コピーの導入遺伝子を持つ系統16cK ついても、 GLS場性およびハイグロマイシン抵抗性の各 2 8

これらの結果は、アグロバクテリウムによりイネに導 入された遺伝子が、植物細胞の核に組み込まれ、メンデ ルの法則に従って、後代に遺伝したことを示すものであ の遺伝子が組み込まれたことを示唆するものである。

サザン解析による形質転換 体における導入遺伝子のコ ピー数および形質転換次世 代における母入遺伝子の発 現(品稿:朝の光) 郑

¥	4	大学		次世代個体数		
5 TRE	VIII V	17-7 17-17	ハイグロマハ	ハイグロマイシン抵抗性	SE	CLS発現
<u> </u>	¥	1 ≅	抵抗性	科益學	蓋	첉
农	外限	1	0	09	0	ล
<u> </u>	-2	~	ଞ	0	8	-
2	-1	*2	3	83	ន	c
<u></u>	-2	~	83	-	13	-

*2 コピーの導入遺伝子のうち1つのは制限断片が 短く、導入遺伝子は不完全。

サザン解析による形質転換 体における導入遺伝子のコ ピー数および形質転換吹車 代における導入遺伝子の発 £3

		CLESPESTE.	STATE RANGE
		(CE)	SO.M.
<i>нож</i>)	次世代個体数	ハイグロマイシン抵抗性	10.55 M:
現山西橋:月の光		~40071	析符件
	談	3字7 7 ロ (1
	139 533	2 00	t i

2	第八		次世代個体数		
óin Caxt	4十7 7 Li	ハイグロマイ	ハイグロマイシン抵抗性	SS	CLS SETT
ŧ	数	抵抗性	母養婦	羽棚	数数
17	8	88	1#	1	1
18a*	_	R	ß	15	<u>م</u>
₫	_	8	8	2	2
6	2	47	22	1	1

★ 次世代についてサザン法による導入遺伝子の分 析を行った。

2

(1) トウモロコン昭徽

トウモロコシ品種A188,F1 (A188x Black Mexican Swe et) ,F1 (A188x 873/tt) ,F1 (B73/tt x A188) ,F1 P3732 を材料として選定した。A188,Black Mexican Sweet,B73 氏のいずれの名品種は森林水産省生物資源研究所から、 また、P3732は岱田路農協同組合から各々入手した。

(2) 生長点近傍組織の調製

ナトリウムに5分間浸漬した。 威菌水で3回洗浄後、LS 100-127, 100mg//カザミノ酸、700mg//プロリン、20g/ 下で4日間培養後、発芽した幼苗から頂端分裂組織を含 ン類;Linsmaier,E.and Skoog,F.1965;Physiol.Plant18; 完整種子を70%エタノールに1分間、1%次亜塩素樹 Iショ糖、2.3g/Jゲルライト) に置床した。25°C、暗黒 固体结婚(Linsmaier and Skoogの無機塩およびピタミ む約0.1 × 0.3mの超額を切り出し以下の実験に供試し 20

(3) 未熟胚由来カルスの調整

ロリン、1.5mg/1 2,4-D、20g/1ショ糖、2.3g/1ゲルラ **機塩およびアタミン製、100mg/1セザミノ酸、700mg/1ン** イト)に固味した。3週間培養後、形成された胚盤由来 未熟版をLSD1.5固体培造 (Linsmaier and Skoogの無 カルスを以下の実験に供試した。 8

(4) アグロバクテリウムの菌系

実施例 1 に示したア グロバクテリウムの箇条のうち、 LBA4404 (pTU/C32) およびEHA101 (pIC1211h) を用い

(5) アグロバクテリウム黙慰液の調整

た体正AA倍地に懸濁し、館浪度を3~5×10°細胞/m1に リウムのコロニーを白金耳でかきとり、実施例1に示し c イグロレイツン (SOmg/L) わわナレイツン (SOmg/ 1)を含むAd倍地上で3~10日間培養したアグロバクテ 調整し格種に用いた。 6

(6) 生長点近傍組織への接種、培養条件

切り出した組織をガラス針で穿刺後、上述のアグロバ 100μ Mアセトシリンゴン、20q//ショ苺、10g//グルコ ースを含む修正に国体培地 (Linsmaier and Skoogの無 クテリウム懸濁液に3~10分間没漬した。浸漬処理後、

数価数、Murashige and Skoogのアタミン盤;Murashige

S

3

.and Skoog, F. 1962; Physiol. Plant. 15:473-497, 0.1m ト) に移植し、25C、原明下で2~3日間培養した。 そ 同議度のセフォタキシムを含むLs固体培地で培養を続け g/1カイネチン、1.0kg/1カザミノ酸、2.3g/1ゲルライ の後、250mg/1セフォタキシムを含む被菌水で洗浄し、

(1) カルスへの接種、培養条件

固体培地に移植し、25℃、暗黒下で3日間共存培養をお む被菌水で洗浄し、同濃度のセフォタキシムおよび30mg カルスを前述のアグロバクテリウム懸御後に約5分間 没強後、実施例1に示したアセトシリンゴンを含む2NG Cなった。その後カルスを250mg/1セフォタキシムを含 ハハイグロマイシンを含むLSD1.S固体培地で培養を続 け、系質転換カルスの選抜を行った。

(8) GUS活性の調査方法

費を棋続した茎頂組織およびカルスについて実施例1の 共存培養処理直後の基頂組織ねよびカルス、その後培 方法にもとづきGIS古性を調査した。

(9) 塞頂組織への遺伝子導入

発現を示すものは全くなかった。 生長点近傍は非常に徴 とした形質転換が可能である車を確認するため、前述の アグロバクテリウム菌系EHAJOJ (pIG1211h) を単儲した **傍へのアグロバクテリウムによる形質転換には生長点の** 続けた植物体でGLS活性を調査したところ、GLS遺伝子の 細な組織であり、そこに穿刺しアグロバクテリウムを感 なさせることは容易でない。 本実験の結果から生長点近 した。アグロバクテリウム非処理の組織では、いずれも 発現が小さな点状に認められた。しかし、その後培養を 切り出し、穿刺などに熱媒した技術が必要であると考え Gould5の報告 (Gould).,et al.1991;Plant Physio .95:426-434) による生長点組織(塞頂組織)を材料 茎頂組織に処理し、生長した植物体でのGISS古性を調査 Qus遺伝子の発現はみられなかったが、アグロバクテリ ウム処理した組織では針で穿刺した部分にCIS遺伝子の

表10 トウモロコン基頂組 機への遺伝子導入

	9				
GLS発現のみられた植物体数	0	•	•	•	0
得られた 植物体数	2	9	2	0	2
茎頂の伸長 した組織数	6	∞	13	-	7
集政組織数	22	16	17	14	13
災職	1	7	ಣ	7	2

24

特許2649287

聚	供試和機能	差項の伸及 した組織数	問られた 植物体数	のIS地域のみら のIS地域のみら
8	88	14	90	0
2	8	7	_	0

供試品権はいずれもP3732

(10) トウモロコシの品種および供試箇系による遺伝子 導人効率の違い

(表10)、処理カルスに対するのは終色制位の大きさも1 された。供試したアグロバクテリウムのパイナリベクタ ーpICI21HatsよびpTCIC32はCUS登伝子中にヒッのイント ロンが个在しているため、アグロバクテリウムの細胞の がみられた。EH4101(pIG1211th)、LBA4404(pT0K232) の名以上のものが多く、 内部国の首数や遺伝子発現が示 中ではCINAICHを発現しない。このことから、トクモ 供試したいずれの品種でも高知度ではお遺伝子の発現 の樹米国での遺伝子発現効率の遊は認められなかった ロコシのカルスにおいて認められたQS遺伝子の発現

は、アグロパクテリウムにより高頻度で遺伝子導入が行 われたことを示すものである。共存培発後、ハイグロマ イシンを含む固体培地上で培養することにより、供試力 質析被笛쩘であるとおえられる。 これらのコンパクトか E.and Lusardi,M.C.1988;Maydica XXXIII:163-177) K 物強した細胞は a k 遺伝子の発現を示したことから、形 ラスの一部カコンミケーむれる状のカルメが破職した。 C A状の形質転換カルスはLupottoらの方法(Lupotto, より再分化可能である。 2

表11 トウモロコシカルスへの DIS遺伝子の導入効率

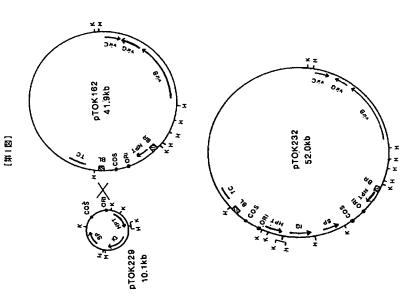
	品種	商株	歯体 GIS・のカルス数/処理カルス数 (%)
	A188	-	32/35(91)
	881¥	-	34/34(100)
	A188~845	-	41/49(84)
	A1889/873	-	35/42(83)
	4188	2	39/40(98)
	881v	2	40/40(100)
	A188×845	~	38/40(95)
0	A188×873	~	31/40(78)
	B73×4188	7	29/35(83)

BMS: Black Mexican Sweet

图系1:EIA101(p1G1211hm),2:LBA4404(pTOX222)

特許2649287





レロントページの数数

(56)参机文权

第 国際公開91/207 (WO, A 1) 国際公開92/9696 (WO, A 1) B I O/TECHNOLOGY, 8 (1990) P. 33-38 Proc. Natl. Acad. Sc i. USA, 88 (1991) P. 10426-10430

Plant Cell Report s, 8 (1990) P. 303-306 首雄, 44 [別1] (1994) P. 52